

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P) (12) 特 許 公 報 (B 2) (11) 特許番号

第 2 5 7 6 9 7 0 号

(45) 発行日 平成 9 年 (1997) 1 月 2 9 日

(24) 登録日 平成 8 年 (1996) 1 1 月 7 日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 15/09		9162-4B	C12N 15/00	A
1/21		7804-4B	1/21	
//(C12N 1/21				
C12R 1:125)				
(C12N 1/21				

発明の数 1 (全 1 4 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願昭 6 0 - 2 7 8 8 5 0	(73) 特許権者	9 9 9 9 9 9 9 9 9 ノボ ノルディスク アクティーゼルス カブ デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエル ト, ノボ アレ (番地なし)
(22) 出願日	昭和 6 0 年 (1985) 1 2 月 1 1 日	(72) 発明者	ベルジェ クラグ デイデリヒセン デンマーク国, デイケー - 2 9 0 0 ヘレラツブ, エステルスベイ, 3 2
(65) 公開番号	特開昭 6 1 - 1 3 9 3 9 2	(74) 代理人	弁理士 青木 朗 (外 3 名)
(43) 公開日	昭和 6 1 年 (1986) 6 月 2 6 日	審査官	佐伯 裕子
(31) 優先権主張番号	5 9 4 0 / 8 4		
(32) 優先日	1 9 8 4 年 1 2 月 1 2 日		
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		
微生物の受託番号	N C I B 1 2 0 2 9		
微生物の受託番号	N C I B 1 2 0 3 0		
微生物の受託番号	N C I B 1 2 1 8 1		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換された細菌による所望産物の製造方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 形質転換された細菌を適当な栄養培地中で培養し、培養物から所望産物を回収することを含んで成る所望産物の製造方法において、前記細菌は染色体 dal 遺伝子中に欠陥を有し、該細菌は dal 遺伝子を含有する発現ベクターを含み、それによって該細菌の該染色体欠陥により生ずる該細菌の要求性を補完することができ、そして該発現ベクターは前記所望産物をコードする DNA 配列をさらに含有している、ことを特徴とする方法。

【請求項 2】 細菌がバチルス属の種である特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 3】 バチルス属の種が枯草菌である特許請求の範囲第 2 項記載の方法。

【請求項 4】 細菌が腸内細菌種である特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

2

【請求項 5】 腸内細菌種が大腸菌である特許請求の範囲第 4 項記載の方法。

【請求項 6】 前記 dal 遺伝の欠陥が該 dal 遺伝子の突然変異であるか、又は該 dal 遺伝子中の少なくとも一部分の欠失である、特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 7】 前記 dal 遺伝子の欠陥が、Dal' 表現型の発現に必要な dal 遺伝子の一部分と、dal 遺伝子の一部分であるか否かに拘らず、該 Dal' 表現型の発現に必要な dal 遺伝子の一部分に直接に接している Dal' 表現型の発現に必要な DNA との両方の欠失である、特許請求の範囲第 5 項又は第 6 項記載の方法。

【請求項 8】 前記発現ベクターが、枯草菌由来の dal 遺伝子の機能的部分を有するプラスミドまたはバクテリオファージである特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

〔産業上の利用分野〕

本発明は、収率増加または醗酵製品の品質向上の目的で抗生物質または他の不所望な成分を増殖培地へ添加することが不要な、培養の間に細菌の染色体外遺伝体を安定化する新規方法に関する。

〔従来技術および発明が解決しようとする問題点〕

染色体外性遺伝体、たとえばプラスミドを含む微生物は、一般に、遺伝子がしばしば非可逆的に損なわれうるという意味で不安定であると言われている。この不安定性は、プラスミドが宿主微生物に固有のものでない場合たとえばこれが他の生物からの遺伝子からなるかまたは遺伝子スプライシングにより構築される場合、特に助長される。

プラスミドの安定性を増すために、染色体ではなくプラスミドが耐性を与える抗生物質または他の生物活性化化合物が、微生物の培養に用いられる培地へ通常添加される。このような培地においては、抗生物質耐性遺伝子を有するプラスミドを保持する細胞のみが増殖する。この方法の主な欠点は、抗生物質耐性菌の大規模増殖と、環境に対し好ましくない作用を有する可能性のある増殖培地に対し高価な抗生物質の添加と、それに続いて大規模精製により所望の生成物から抗生物質を除去することが必要であるということである。

宿主染色体の栄養要求性突然変異の相補性はプラスミド安定化の別の公知方法である。しかしながら、この方法は増殖培地の組成を厳しく制限し、宿主微生物に要求される栄養を含まない増殖培地での培養を必要とし、これにより生産性向上のために入手しうる機会を制限する。

本発明の目的は、抗生物質の使用を必要とすることなく、また増殖培地の組成を厳しく制限することなく、形質転換細菌における染色体外遺伝体を安定化する方法を提供するものである。

本発明の他の目的は、安定化された染色体外遺伝体とこのような安定化染色体遺伝体を含む形質転換細菌を提供するものである。

本発明の他の目的は、抗生物質を使用する必要がなくまたは増殖培地の組成を特別制限することなく形質転換細菌に所望の産物を製造する方法を提供するものである。

本発明のその他の目的は、関係する技術分野における当業者にとって明らかであろう。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、与えられた条件下で染色体外遺伝体が宿主の正常増殖に必要な一定の機能を有する場合には、通常の培地で培養する間に宿主細菌において染色体外遺伝体が保持されうるという発見に基づく。

与えられた条件下で宿主の正常増殖に必要とされる機能をコード化する遺伝子に突然変異、欠失または他の欠陥を有する宿主細菌を、たとえばこの機能をコード化す

る遺伝子を有するプラスミドで形質転換すると、プラスミドで形質転換されプラスミドを保持する細菌のみが、宿主細菌の要求がプラスミドで補なわれるために生残るであろう。しかしながら、プラスミドから染色体への遺伝情報の転換が行なわれなかったり、宿主細菌のこのような要求のない突然変異体への自然突然変異速度がわずかなである場合、プラスミドの永久的維持が保証されるだけである。

本発明の第一の面によれば、培養の間に細菌における染色体外遺伝体を安定化する方法を提供するものであり、該方法は、

細胞エンベロープの合成または維持に必要な構造的または機能的成分をコード化するDNA列を含む染色体外遺伝体を提供し；

このような構造的または機能的成分に対する染色体遺伝子に欠陥を有する宿主細菌を前記DNA列を含む染色体外遺伝体で形質転換し；

これにより宿主細菌の染色体遺伝子欠陥により起こされる要求を染色体外遺伝体により抑え、培養の間の染色体外遺伝子の損失を少なくする；

ことからなるものである。

さらに本発明は、自然突然変異による染色体欠陥の抑制が少ない宿主細菌の構築、および宿主細胞の染色体欠陥を補うDNA列が染色体外遺伝体の残りから別かれて宿主の染色体へ転移することができない染色体外遺伝子の構築を含む。

ここで使用するように、「発現ベクター」は、本明細書において「染色体外遺伝体」とも称し、プラスミド、バクテリオファージまたは宿主細菌には通常存在しない独立した分子または染色体と融合した遺伝子物質を意味する。バクテリオファージおよび他のベクター系または染色体へのDNA組込み体も当業者に対し本発明を説明するが、染色体外遺伝体はプラスミドであるのが好ましい。

さらに本発明は、形質転換細菌において所望の生成物（すなわち、DNA, RNA, ペプチドおよびタンパク質）を作る方法であって、次の工程からなる方法を提供するものである：

i) 細胞エンベロープの合成または維持に必要な構造的または機能的成分をコード化するDNA列とii) 前記所望の生成物をコード化する遺伝子とを含む複合染色体外遺伝体を提供し；

前記構造的または機能的成分に対する染色体遺伝子における欠陥を有する適当な宿主細菌を前記複合染色体外遺伝体で形質転換し；

適当な栄養培地中で形質転換した細菌を培用し；そして

培養培地から所望生成物を回収する。

本発明はまた、形質転換細菌における所望生成物を作る方法を提供するものであり、この方法は、

10

20

30

40

50

細胞エンベロープの合成または維持に必要な染色体遺伝子に欠陥を有する細胞であって宿主細菌の染色体欠陥により起きる要求を抑制することができ、また前記所望生成物をコード化するDNA列をも含む複合染色体外遺伝体を含む細菌を適当な栄養培地で培養し；そして

前記培養培地から所望生成物を回収する；
ことからなるものである。

適当な宿主細菌は、バチルス種または腸内細菌科種に属する細菌、たとえば枯草菌または大腸菌であるが、他の適当な細菌を使用することは当業者には明らかである。

発明の詳細な記載

記載において、次の語が用いられる。

dal' 遺伝子: D, L-アラニンラセマーゼ遺伝子

dal' 遺伝子: D, L-アラニンラセマーゼ機能遺伝子 (野生型)

dal-1 遺伝子: 外来D-アラニンに対する要求を通常起こすD, L-アラニンラセマーゼ遺伝子において突然変異を有する遺伝子

dal' 宿主: dal' 遺伝子における突然変異を有する宿主 (ここでは増殖のためにD-アラニンの外来供給を通常要求する)

dal' 宿主: 野生型dal' 遺伝子を有する宿主

Dal' 宿主: 外来D-アラニンに対する要求を持たない宿主

Dal' 宿主: 外来D-アラニンに対する要求を有する宿主

Com^r: クロラムフェニコール耐性

Kan^r: カナマイシン耐性

Amp^r: アンピシリン耐性

bla: Amp^r を起こすβ-ラクタマーゼ用遺伝子

Cat: Cam^r を起こすクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ用遺伝子

amyM: マルトゲニックアミラーゼ用遺伝子

多くの細菌の場合、増殖と分割の可能性は、凹所を支持する細胞エンベロープ (すなわち、細胞膜、細胞壁および関連構造分) による。エンベロープの破裂または崩壊、一般に溶解または増殖の停止につながる。

枯草菌および他の多くの細菌において安定な細胞エンベロープに関係する成分の1つのD-アラニンである。D-アラニンは細胞壁の必須成分であり、多糖鎖を架橋してこれにより細胞壁へ必要な堅さを付与する働きをする。D-アラニンは多くの一般的増殖培地には存在せず、普通は、枯草菌および大腸菌のような多くの細菌が酵素D, L-アラニンラセマーゼを用いてL-アラニンからこのアミノ酸を合成して、増殖のためにD-アラニンの外部供給を必要としない。突然変異体の中には、たとえば突然変異によってD, L-アラニンラセマーゼ遺伝子が損なわれた枯草菌のdal-1突然変異体のように、増殖のためにD-アラニンの外部供給を必要とするものもある「フリーズら (Freese et al.), プロシーディング

オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス、51:1164-72, 1964, デュルら (Dul et al.), ジェイ. バクテリオール (J. Bacteriol), 15:1212-14, 1973」。他の突然変異体も細胞エンベロープの維持のために他の代謝物、たとえばジアミノピメリン酸、D-グルタミン酸およびN-アセチルグルコサミンの外部供給を必要とするものもある。

本発明によれば、dal' 遺伝子がプラスミドから染色体へ転移することができず、宿主のDal' 表現型への自然突然変異の頻度がわずかで、そして細胞が外来D-アラニンを利用しない場合には、D, L-アラニンラセマーゼ機能遺伝子を有するプラスミドがdal' 宿主においてそれらの維持を確保するということが証明された。

すなわち、適当なdal' プラスミド中に所望産物の遺伝子を挿入し、このプラスミドを適当なdal' 宿主中で培養することにより、dal' プラスミドは増殖の間細胞集団中に維持され、プラスミドの自律的複製の間に表われる所望産物の高収率を確保する。多くの通常の増殖培地にはD-アラニンがないので、これら培地へさらに制限を加えることはない。

したがって、本発明は、培養の間に所望産物の遺伝子を有する染色体外遺伝体を安定化する便利な方法を提供するものである。

宿主のDal' 表現型への自然突然変異の割合がわずかであることを確実にするために、dal' 遺伝子の一部を欠失することが必要であることもある。

しかしながら、このようなDal' 表現型の表現に必要なdal' 遺伝子の一部を欠失した宿主を、完全なdal' 遺伝子および染色体欠失部の両端に側面を接するDNAと相同の部分を含むdal' プラスミドと組み合わせることにより、プラスミドから染色体へのdal' 対立遺伝子の転換が相同交差 (homologous crossover) により起きうる。このような相同交差を避けるために、染色体中のdal' 遺伝子と側面を接する部分へdal' 欠失部を延長するように宿主を構築する。また、染色体中の欠失部の両端に側面を接するDNAと相同のDNAではなく機能的dal' 遺伝子を有するようにプラスミドも構築する。この後者のプラスミドを前者のdal' 宿主と組合わせて好ましい宿主ベクター対を構成する。

これに代わり、組換え体欠失宿主を用いるかまたは宿主細菌の染色体と相同のDNAなしでもしくは少量とともに染色体外遺伝体dal' を用いるかのいずれかにより、dal' 対立遺伝子の転移を防ぎうる。

dal' 遺伝子は、後にさらに詳述するように、枯草菌から導びくのが好ましい。dal' 遺伝子に加えて、プラスミドは、プラスミド複製のための部分、たとえばバチルス菌または他のグラム陽性菌における複製のために高速コピープラスミドpUB110からの複数機能または腸内細菌科もしくはグラム陰性菌における複製のためにpBR322の複製機能をも含む。

本発明による所望産物の製造は、それ自身のプロモータにより表現されるバチルス菌 (NCIB11837) からマルトゲニックアミラーゼを作ることにより説明される。本発明により作られうる所望産物の他の例は、アミラーゼ、アミログリコシダーゼ、プルラナーゼプロティナーゼ、リパーゼ、ホルモン、および他の酵素または真核性タンパク質およびペプチドである。

本発明を添付の図面を参照してさらに説明する。第1図は、プラスミドpDN 691, pDN 770, pDN 820およびpDN 1050の構築を表わし、

第2図はpDN 1122の構築を表わし、

第3図はプラスミドpDN 1090, pDN 1120, pDN 1222およびpDN 1277の構築およびpDN 1000の制限酵素部位の地図を表わし、

第4図はプラスミドpDN 1130およびpDN 1290の構築を表わし、

第5図はプラスミドpDN 1274の構築を表わし、

第6図はプラスミドpDN 1800の構築を表わす。

本発明方法は、抗生物質を含まない培地中で形質転換細菌の培養を行なうことができるようにするものである。しかしながらこれは本発明の操作上の条件ではなく単にその結果であるということは理解されるであろう。抗生物質存在下に本発明の形質転換細菌を培養することが好ましいかまたは有用であるならば、勿論そのようにすることができる。

詳細な説明

dal' は、枯草菌168に由来するDN497から得られる「スピジーゼン (Spizizen)、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. 44, (1072-78, 1958)]。染色体DNAは適当な制限酵素を完全に消化し、クロラムフェニコールとカナマイシンに対する耐性を与え、枯草菌において複製しうるプラスミドpDN 691と連結する。連結したDNAを、D-アラニン要求の相補性を選択するD-アラニン要求性枯草菌dal-1へ形質転換する。付随的にCam^r (クロラムフェニコール耐性) になったDal' 形質転換細胞は、Dal' とCam^r 表現型が連結したpDN 691由来の組換えプラスミドを含有する。多分、染色体とプラスミド間の相同組換えのためであろうが、非常にわずかの量のプラスミドが形質転換細胞中に検出されることもある。

プラスミドの染色体への組換えとそれに続く組込みを避けるために、このDal' Cam^r 形質転換細胞からプラスミドを調製し、Dal' を選択するD-アラニン要求性で組換え欠失株DN733 dal⁻ recE⁻ に形質転換する。形質転換細胞は付随的にDal' Cam^r とKan^r (カナマイシン耐性) になる。

形質転換細胞は約16Kbの少量のプラスミドを含む。このプラスミドから、Dal' 表現型を与える2.0Kb ClaI-Sp

4.6Kbの組換えプラスミドpDN 1000が得られる。しかしながらこのプラスミドは相同組換えによるdal' 対立遺伝子で組換え可能な株の染色体 (たとえばDN 608) におけるdal-1突然変異体と置き換えることができ、付随的Com^r 選択性を有することのないDal' 表現型の選択性はプラスミドの維持をこれ以上保証しないであろう。

相同組換えによるdal' 対立遺伝子の染色体への転移とそれに続くプラスミドの損失を避け、Dal' 表現型を生じる突然変異の頻度を減らすために、宿主のdal遺伝子と隣り合う部分の両方の欠失を宿主染色体で行ない、クローン化dal遺伝子を制限酵素EcoR 1とEcoR 5で切断し、次いでエキソヌクレアーゼBal 31を消化する。消化混合物を連結し、Cam^r 選択性締結DN 608, dal⁻ へ形質転換する。dal遺伝子中に欠失を有するプラスミド含有形質転換体はDal⁻ Cam^r として固定される。dal遺伝子に適当な欠失を有する宿主株を作るためにdal' 宿主を欠失プラスミド、pDN 1274 Com^r dal⁻ の1つと形質転換させる。

Cam^r 選択性の約0.1%形質転換体はDal⁻ であり、これは多分染色体dal' 遺伝子が相同組換えによりpDN 1274からのdal⁻ 欠失で置き換えられたためであろう。D-アラニンの存在下でクロラムフェニコール不在下に増殖すると自然にpDN 1274が失われ、その後もプラスミド不含有株DN 1280はDal⁻ のままである。DN 1280からの染色体DNAのサザン法分析によれば、実際これは予期したdal⁻ 欠失を有することがわかる。このdal⁻ 欠失宿主、DN 1280株は、完全なdal' 遺伝子および染色体における欠失部の両端に接するDNAと相同の部分の両方を有するdal' プラスミド (たとえばpDN 1090) で形質転換する。したがって、相同組換えによりdal' 遺伝子のプラスミドから染色体への転移が起こることができ、宿主がdal⁻ へ転換することができる。それゆえ、プラスミドの維持はもはやDal' 表現型に対する条件でなく、プラスミドはしばしば消失する。次いで、上述したように宿主染色体の欠失部と接するDNAと相同のDNAではなく完全なdal' 機能遺伝子を有するdal' プラスミド、pDN 1277を作る。したがって、pDN 1277を用いたdal⁻ 欠失宿主の形質転換と同時に相同組換えによりdal' のプラスミドから染色体への転移が起こらない。それゆえ、DN 1280は、D-アラニンを含まない培地中で、通常は染色体中でdal遺伝子と接するがDN 1280では欠失されたEcoR 5部位を含むDNAを有しないdal' プラスミドに対し適当なdal' 宿主である。

化学的または商業的に興味のあるクローン遺伝子が実際に上述の宿主ベクター系によりD-アラニン不含有培地中でプラスミドに保持されることを確認するために、バチルスC 599 (NCIB 11837) からのマルトゲニックアミラーゼに対する遺伝子をdal' プラスミドへ転移させる。2つのプラスミドpDN 1130とpDN 1290を作る。2つのプラスミドは両方ともプラスミドpUB 110の複製機能と機能dalおよびamyM遺伝子を有する。いずれのプラスミドもいかなる抗生物質に対しても耐性を与えない。プ

ラスミド pDN 1130 と pDN 1290 を上記枯草菌株 DN 1280 へ形質転換する。DN 1280 株は、上述したように、*Dal*⁺ 表現型の表現に必要な *dal* 遺伝子の一部と *Dal*⁺ 表現型に必要なではない隣接部分であって *dal* 遺伝子の一部であるかそうでない部分の両方を含む染色体欠失を有する。欠失の後の部分は pDN 1290 には含まれていない。したがって、*dal*⁺ 遺伝子は二重相同組換えにより pDN 1290 から染色体へ転移することはできない。一方、プラスミド pDN 1130 は染色体中で欠失した完全な部分と隣接部分の両方を有する。このため、*dal*⁺ 遺伝子のプラスミドから染色体への転移とそれに続くプラスミドの消失が生じうる。

得られた形質転換株 DN 1297 (=DN 1280 pDN 1130) と DN 1300 (=DN 1280 pDN 1290) を、培養の間のプラスミド安定性について試験する (実施例 7 参照)。DN 1297 を培養すると染色体において *dal*⁺ 遺伝子を復元する相同交差が起こり、プラスミドと *Amy*⁺ 表現型の両方ともがしばしば消失する。

DN 1300 を培養すると、D-アラニン不含有培地での増殖時にプラスミドで与えられる *Amy*⁺ 表現型の消失は見られない。しかしながら、D-アラニンを培地へ加えると、細胞はしばしばプラスミドを失くし、*Amy*⁻ *Dal*⁻ になる。すなわち、商業的に興味のある非本来の遺伝子を有するプラスミドが抗生物質を含まない培地中で安定に維持されることが示される。

プラスミドがまた D-アラニン要求性を抑えることによりグラム陰性菌中でも維持されることを示すために、枯草菌の *dal* 遺伝子を D-アラニン要求性大腸菌突然変異体におけるプラスミド中でクローン化し、この要求性を補うことが示された。

次の実施例により本発明の詳細をさらに説明する。
実験

プラスミドと染色体 DNA の調製および枯草菌と大腸菌の形質転換は、次の一般的な手法により行なわれる。制限酵素の消化、*Bal* 31 ヌクレアーゼ処理、オリゴ-DNA-リンカー挿入および DNA の T4-リガーゼを用いた連結は、供給者により示された条件下で、ニュー イングランド バイオラボズ (New England Biolabs) からの酵素を用いて行なわれる。

菌株

すべての枯草菌株は、彼草菌 168 (スピージーゼン、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス、44:1072-78, 1958) の誘導体である。RUB 200:aro I 906, *amy* E07, *amy* R2 は、ドクター フランク ヤング (Dr. Frank Young)、ユニバーシティ オブ ロチェスター (University of Rochester)、ニューヨークから得た。SL 438:trpC2 (孢子形成およびプロテアーゼ欠失) は、ドクター キム ハーディ (Dr. Kim Hardy)、バイオジェン (Biogen)、ジュネーブから得た。DN 497:*amy* E07, *amy* R2 は、SL 438 からの染色体 DNA を用いた RUB 200 の *aro*⁺ 形質転換体であり、QB 1133:a

ro I 906, *met* 85, *sac* A321, *amy* E はドクター ジョージ ラポポール (Dr. Georges Rapoport)、IRBM、パリから得た。QB 1130:*dal*, *met* B5, *sac* A 331, *amy* E は、バチルス ジェネティック ストック センター (Bacillus Genetic Stock Center)、コロンバス、オハイオから得た。DN 608:*dal*-1, *met* B, *sac* A, *amy* E は、QB 1130 からの染色体 DNA を用いた QB 1133 の *aro*⁺ 形質転換体である。MT 120:*len* B6, *rec* E4 *r*₊ *m*₊ は、ドクター テルオ タナカ (Dr. Teruo Tanaka)、三菱化成生命化学研究所、東京から得た。DN 773:*dal*-1, *may* E, *rec* E, *sac* A は、MT 120 からの染色体 DNA を用いた DN 608 の *met*⁺ *rec* E 形質転換細胞である。DN 606 はプラスミド pUB 110 で形質転換された DN 608 である。

大腸菌株 TKL 10:*thr*-1 *leu*B6, *cod* A1, *trp*-64, *pyr* F 101, *nis* 108, *thy* A6, *arg* G66, *ibv* A634, *thi*-1, *alr*-1, *deoc*1, *lac*Y1, *ton* A21, *tsx* 95, *sup* E44 (ウィズマン (Wisman)、ジェネト. レス., キャンプ. (Genet. Res., Camb.) 20:269-77, 1972) は、ドクター バーバラ バックマン (Dr. Barbara Bachmann) ザイーコリ ジェネティック ストック センター (the E. coli Genetic Stock Center)、コネチカット, U.S.A (CGSC 5466) から得られる。

プラスミド

2.7Kb の pUC9 はアンピシリン耐性であり、pBR 322 から誘導される「ヴィエイラ (Vieira) ら、ジーン (Gene) 19:259-68, 1982」。4.4Kb の pBR 322 はアンピシリンとテトラサイクリンに対し耐性を与える「ボリヴァー (Bollivar) ら、ジーン (Gene) 2:95-113, 1977」。

プラスミド pUB 110 と pBD 64 「グリクツァン (Gryczan) ら、ジェイ. バクテリオール (J. Bacteriol.) 134:318-329, 1978 および グリクツァン ら、ジェイ. バクテリオール. 141:246-53, 1980) は、それぞれ枯草菌株 BD 366 と BD 624 から単離される。pUB 110 と pBD 64 は両方ともカナマイシンに耐性を与え、pBD 64 はまたクロラムフェニコールに耐性を与える。枯草菌株 BD 366 と BD 624 はバチルス ジェネティック ストック センター (Bacillus Genetic Stock Center)、コロンバス、オハイオ、米国から得られた (株のファイル番号 BGSC 1E6 および 1E22)。7.6Kb のプラスミド pDN 452 はクロラムフェニコールとカナマイシンに耐性を与え、枯草菌 NCIB 11837 からのマルトゲニック アミラーゼに対する構造遺伝子を有する。pDN 452 の構築は EP 特許出願第 84301994.4 に記載されている。

1. 枯草菌の形質転換

コンピテント枯草菌細胞は、ヤスビン (yasbin) らにしたがって調製される (ジェイ. バクテリオール. 121:296-304, 1975)。次いで遠心分離 (700rpm, 3分間) により細胞を集め、20% グリセロールを含む上清液の容量に再懸濁させ、液体窒素で凍結し、-70℃ で貯蔵する。形質転換のために、凍結細胞を 42 溶かし、1 容量の

緩衝液と混合する (0.4% グルコース、0.04M MgCl₂ および 0.002M EGTA を有するスピジーゼンの最小培地 (スピジーゼン、プロシーディング オブ ナショナル アカデミイ オブ サイエンス, USA 44:1072-78, 1958))。DNA を加え混合物を 20 分間 37℃ で振とうしながらインキュベートする。次いで細胞を適当な選択培地上にプレートする。

II. 大腸菌の形質転換

LB (10g バクト トリプトン Bacto tryptone, 5g バクト 酵母抽出物 および 10g NaCl/l (水), pH 7.0) にて大腸菌 K-12 株 No. 802 を一晩培養したものを 500ml LB 中で 100 倍に希釈し、37℃ で OD₄₉₀ = 0.4 まで増殖する。培養物を急冷し、15 分間氷中に放置し、15 分間 3000rpm で回転させ「ソルバル (Sorvall) GS3 ローター」、冷 0.1M CaCl₂ 200ml 中に再懸濁させ、20 分間氷中に放置し、10 分間 3000rpm で回転させ、冷 0.1M CaCl₂ 5ml 中に再懸濁させ、20 時間氷中に放置する。次いで冷グリセロールを 10% まで加え、液体窒素中でアリコート凍結し、-70℃ で保存する。凍結細胞を氷中で溶かし、DNA を加え、混合物を氷中で 45 分間、37℃ で 2 分間インキュベートし、次いで適当な選択培地上にプレートする。

III. 大腸菌からのプラスミドの調製

250ml LB, 0.4% グルコース および 適当な抗生物質中で大腸菌を一晩増殖させる。遠心分離により細胞を採集し、4ml 緩衝液 1 (0.025M トリス・HCl, pH=8.0, 0.01MEDTA, 0.05M グルコース, 2mg/ml リゾチーム) に再懸濁させる。懸濁液を 0℃ で 15 分間インキュベートし、次いで 8ml 緩衝液 2 (0.2M NaOH, 1% SDS) と混合する。次いで 6ml 緩衝液 3 (3M Naアセテート, pH=4.8) を加え、混合物を 60 分間 0℃ に保ち、続いて 20 分間 19000rpm (ソルバル SS34 ローター 中約 45000g) で遠心分離する。上清液を 0.6 容量の冷イソプロパノールで沈でんさせ、1.2ml 5TE (0.05M トリス・HCl, pH=8.0, 0.005M EDTA) と 20μl 沸とう RNアーゼ A (ペーリンガー) (2mg/ml) に再懸濁させる。30 分後、溶液を、VTi65 試験管中で、4.0ml 緩衝液 4 (80g CsCl と 56ml 5TE) と 0.1ml EtBr (10mg/ml エチジウム ブロミド) の上面に層状にする。混合物を 20 時間 45000rpm で遠心分離する。次いでプラスミドをこの試験管から除き、透析し、VI で記載するように抽出する。

VI. 枯草菌からプラスミドの調製

大腸菌株について記載したように (III 参照) ただし次の変法によりプラスミドを調製する。0.01M リン酸カリウム, pH=7.0 と適当な抗生物質 (たとえば 6 μg/ml クロラムフェニコール) と、必要ならば 100 μg/ml D-アラニンを含む LB 中で増殖を行なう。採集後、細胞をリゾチームとともに 37℃ でインキュベートする。緩衝液 2 の代わりに、緩衝液 2 の 1 容量と緩衝液 5 (0.2M グリシン, 0.2M NaCl および 1% SDS) 3 容量の混液を用いる。以後の工程は III と同じである。

V. 枯草菌からプラスミドの少量調製

LB (0.01M リン酸塩 pH=7.0 と適当な抗生物質および必要ならば D-アラニン) における 5ml 枯草菌からのプラスミドを次に記載したこと以外は IV により調製する: 1: 緩衝液の容量を 4 倍に減少する。2: 緩衝液 3 の後で 0.5ml フェノールと 0.5ml クロロホルムを加える。3: 19000rpm で遠心分離後、上清液をエタノールで沈でんさせ、400 μl 緩衝液 6 (0.05M トリス・HCl pH=8.0, 0.1M Naアセテート) に再懸濁させ、プラスミドを再び沈でんさせ、400 μl 緩衝液 6 に再懸濁させ、沈でんさせ、洗浄し、100 μl TE (0.01M トリス・HCl pH=8.0, 0.01M EDTA) と 1 μg/ml 沸とう RNアーゼ A (ペーリンガー) 中で再懸濁させる。

VI. 枯草菌から染色体 DNA の調製

約 50ml 培養物からの凍結細胞のペレットを 1.1ml 緩衝液 (0.05M トリス・HCl pH=7.4, 0.1M NaCl, 25% ショ糖) に再懸濁させる。100 μl リゾチーム (25mg/ml) と 150 μl EDTA (0.5M, pH=8.0) を加える。混合物を 37℃ で 30 分間インキュベートする。2ml 0.2% SDS を加え、37℃ で 30 分間インキュベートする。混合物 0.95ml につき 1g CsCl と 0.05ml EtBr (10mg/ml) を加え、VTi65 ローター (ベックマン) 中で混合物を 45000rpm, 15℃ で 20 時間遠心分離する。

DNA を波長 UV ランプ下におき、洗浄器で試験管を穿孔することにより除く。EtBr をイソプロパノールで抽出し、溶液を 2 時間 TEE (0.01M トリス・HCl pH=8.0, 0.01MEDTA) に対し透析する。次いで溶液を TEE で 8ml まで調節し、フェノールで 2 回および クロロホルムで 1 回抽出する。0.1M NaCl と冷エタノールで DNA を沈でんさせ、1ml TE (0.01M トリス・HCl pH=8.0, 0.001MEDTA) に溶かす。染色体 DNA の溶液を 4℃ に保つ。

〔実施例〕

実施例 1

プラスミド pDN 1050 の構築 (第 1 図)

プラスミド pBD64 を制限酵素 EcoR I と Sph I で切断し、3.6Kb 断片を大腸菌プラスミド pBR 322 からの 0.56Kb EcoR I-Sph I 断片と連結する。得られた 4.2Kb のプラスミド pDN 691 はクロラムフェニコールとカナマイシン耐性を与える。pDN 691 の 0.4Kb Hind 3-BamH I 断片を大腸菌プラスミド pUC 9 の 0.02Kb Hind 3-BamH I で置き換える。得られた 3.8Kb プラスミド pDN 720 はクロラムフェニコールとカナマイシン耐性を与える。

pDN 720 の 2.8Kb NcoI-NcoI 断片を pDN 770 の 1.8Kb NcoI-NcoI 断片で置き換える。3.6Kb の pDN 770 は pBD 64 の自然欠失であり、クロラムフェニコール耐性を与える。得られた 2.8Kb のプラスミド pDN 820 はクロラムフェニコール耐性を与える。pDN 820 は 1 つの HgiA I 部位が開放し、30℃ で 30 秒間 Bal31 を消化し、これにより 0.1Kb の断片を除去する。得られた直線状断片を、ニューイングランド ヌクレアー (No.1001) からの Bgl2 オリゴヌクレ

オチド リンカーと連結する。Bgl2リンカー 1 個を有しクロラムフェニコール耐性を有する2.7KbのプラスミドpDN 1050が、この連結混合物から単離される。

実施例 2

プラスミドpDN 1122の構築 (第2図)

クロラムフェニコールとカナマイシンへの耐性を与え、パチルス菌C599のマルトゲニックスアミラーゼに対する構造遺伝子amyMを有する7.6KbのプラスミドpDN 452にAvaIを消化させ、エキソヌクレアーゼBal31で処理し、EcoR 1オリゴヌクレオチド リンカー (バイオラボNo. 1004) を凍結させ、EcoR 1を消化させ、T4-リガーゼを凍結させ、Cma⁺ 選択性枯草菌DN 497. amy Eへ形質転換させる。1 個のAmy⁺ 形質転換細胞は6.6Kbのプラスミドp520-20を含む。p520-20aアミラーゼ収率は少なくともpDN 452の収率ほどである。

次いで、p520-20の2.7Kb NcoI-NcoI断片をpDN 770の1.7Kb NcoI-NcoI断片 (実施例 1 のように調製) で置き換える。得られた5.6KbのプラスミドpDN 808はamyMを有し、クロラムフェニコールに対する耐性を与える。

pDN 808の2.6Kb EcoI-SphI断片をpDN 1050の2.4EcoR 1-SphI断片 (実施例 1 で調製) で置き換える。得られた5.4KbのプラスミドpDN 1122はamyMを有し、クロラムフェニコールに対する耐性を与える。

実施例 3

dal遺伝子のクローニング

枯草菌株DN 497由来の染色体DNA約3 μ gとプラスミドpDN 691Cam^r Kan^r 1 μ gに制限酵素Bam IとSphIを完全に消化させる。染色体とプラスミドDNAを混合し、T4-リガーゼを連結し、DN 606: dal⁻ pUB 110: Kan^r へ形質転換する。約200のDal⁺ 形質転換細胞のうち、Dal⁺ 表現型がpDN 691由来の組換えプラスミドと連結することを示唆するように、1つがCam^r になる。このDal⁺ Cam^r 形質転換細胞からプラスミドが調製され、Dal⁺ 選択性のDN 773 dal⁻ recE⁻ 株へ形質転換する。これに付随してDal⁺ 形質転換細胞はCam^r とKan^r になる。形質転換細胞は非常に少量の16Kbプラスミドを含有するだけである。

このプラスミドから、Dal⁺ 表現型を与える2.0Kb ClaI-SphI断片をDN 608: dal⁻ 株のプラスミドpDN 820のClaIとSphI部位にてクローニングし、組換えプラスミド、4.6KbのpDN1000が得られる。

pDN1000における制限酵素部位の地図を第3図に示す。形質転換細胞株DN 1000=DN 608 pDN 1000を、1984年12月7日に、ナショナル コレクション オブ インダストリアル バクテリア (NCIB), トリー リサーチステーション, アバディーン, スコットランドに寄託し、整理番号NCIB 12029が与えられた。NCIBは1977年のブタベスト条約で権限を与えられた国際的寄託機関で、この条約のそれぞれ第9条および第11条にしたがって寄託の永続性と公衆によるこれの入手可能性をはかるものである。

次の観察により、クローニング染色体断片が実際にdal遺伝子 (dal⁻ 突然変異体により定義) を含みD-アラニン要求性を抑えることのできる他の遺伝子を含まないことが確認された:

- 1: 染色体のdal遺伝子とクローニング染色体断片の間の相同組換えを示すように、線状 (非複製) プラスミドはCam^r ではなくDal⁺ に感受性のあるdal⁻ に形質転換する。
- 2: 染色体においてdal⁻ である宿主細菌から調製されるプラスミド約0.2%はdal⁻ である (初期dal⁻ プラスミドと区別のつかない制限酵素パターンを用いて)。染色体突然変異体が相同組換えによりdal⁻ プラスミドへ形質転換したことが示すように、これらdal⁻ プラスミドは染色体dal⁻ 突然変異体を補うことはできない。
- 3: 枯草菌染色体DNAのサザン法分析により、染色体ClaI-SphI断片がpDN 1000からの同じ大きさの断片とハイブリッド形成することが明らかである。すなわち、pDN 1000におけるクローニングの前には何らの大きなdal遺伝子転位が生じなかった。

実施例 4

プラスミドpDN 1130の構築 (第3図および第4図)

dal⁻ 遺伝子を有するpDN 1000 (実施例 3 から) はClaI部位が開放され、エキソヌクレアーゼBal 31を消化し、BamH 1オリゴヌクレオチドリンカー (バイオラボ, No. 1017) で連結される。得られたプラスミドpDN 1090はdal⁻ 遺伝子を有し、クロラムフェニコール耐性を与える。

pDN 1122 (実施例 2 から) をSph 1とBgl2で切断し、4.4Kb断片をpDN 1090の2.0Kb Sph 1-BamH 1断片で連結する。

得られたプラスミドpDN 1130はamyM⁺ とdal⁻ 遺伝子を有するが、しかしクロラムフェニコール耐性を与えない。

実施例 5

プラスミドpDN 1290の構築 (第3図および第4図)

4.5KbのプラスミドpDN 1120 dal⁻ Cam^r は、Sph 1を消化したpDN 1000のエキソヌクレアーゼBal 31消化とBg12とSacIオリゴヌクレオチド リンカー (それぞれバイオラボ, No. 1001とNo. 1005) の両方の挿入により構築される。

pDN 1110は1つのEcoR 5位で開放し、エキソヌクレアーゼがBal 31を消化し、2 個のBgl2オリゴヌクレオチドリンカー (バイオラボ, No. 1001) と連結する。リンカーと1 個のプラスミド末端との融合によりBcl 1位を作る。得られたプラスミドpDN 1222はdal⁻ 遺伝子を有し、クロラムフェニコール耐性を与える。

pDN 1222の0.7Kb Bcl 1-Bcl 1断片は、pDN 1090の3.5Kb BamHI-Bcl 1断片 (実施例 4) と連結する。得られた4.2KbのプラスミドpDN 1277はdal⁻ 遺伝子を有しクロラムフェニコール耐性を与える。プラスミドpDN 1277をDN 1280 (実施例 6 参照) 株へ形質転換し、得られたDN 1517 (=DN 1280 pDN 1277) 株をナショナル コレクシ

ジョン オブ インダストリアル バクテリア, トーリー
リサーチ ステーション, アバディーン, スコットラ
ンドに、1984年12月7日付で寄託した。整理番号はNCIB
12030であった。

さらに、2.6Kb SphI-BamH I断片をpDN 1050 (実施例
1で記載したように調製) からの2.5Kb Sph I-BamH I
で置き換えることにより、pDN 1090を4.5Kbのプラスミ
ドpDN 1120dal⁺ 枢着Cam^rへ転換する。

pDN 1265 amyM^r Cam^r は、EcoR 5を消化したpDN 1120
のBal31エキソヌクレアーゼ消化とそれに続くSph I消化 10
により構築される。2.9Kbの断片を、SacIオリゴヌクレ
オチド リンカー (パイオラボ No.1005) と、EcoR I
を消化しBal31エキソヌクレアーゼ処理により得られたp
DN 1130の2.9Kb断片と連結し、次いでSph Iを消化す
る。

得られた5.8KbのプラスミドpDN 1265はamyM^r を有し、
クロラムフェニコールに対し耐性を与える。

次いで、SphI-Bgl2を用いてpDN 1265を切断し、4.7K
b断片をpDN 1277の1.6Kb SphI-Bgl2断片と連結する。

得られた約6.3KbのプラスミドpDN 1290はamyM^r とdal⁺ 20
遺伝子を有するが、抗生物質耐性マーカーを有しない。
実施例 6

dal⁺ 遺伝子欠失を有する宿主の構築 (第5図)

クローン化dal⁺ 遺伝子における5 μ gのpDN 1090を制
限酵素EcoR IとEcoR 5で切断し、次いでこの断片を60秒
間エキソヌクレアーゼBal31で消化し、連結し、DN 608:
dal⁺へ形質転換すると、プラスミドのDal⁺ 表現型を破
壊する欠失が得られる。これら欠失プラスミドpDN1274
Cam^r dal⁺ の1つを用いてDN 497株を形質転換しCam^r を
選択すると、染色体dal⁺ 遺伝子がpDN 1274からのdal⁺ 欠 30
失で置換されたためであろうがDal⁺ である形質転換細胞
約0.1%が得られる。自然にpDN 1274が失なわれた後、
形質転換細胞はCam^r になるがDal⁺ は残る。この株、DN 1
280の染色体DNAのサザン法分析によれば、実際にこれが
予期したdal⁺ 欠失を有することがわかる。このdal⁺ 欠失突
然変異体のDal⁺ 表現型への逆転を起こすかもしれない突
然変異の頻度は10⁻⁴ 以下である。プラスミドpDN 1277=
DN1517 (実施例 5 参照) を有するDN 1280は寄託され
た。

実施例 7

dal⁺ 宿主におけるdal⁺ amyM^r プラスミドの安定性

宿主-プラスミド組合せDN 1300 (=DN 1280 pDN 129
0) の安定性および染色体欠失部と側面を接するプラス
ミドDNA列と染色体との重なり欠落の重要性を示すた
めに、次の実験を行なう:

DN 1297 (=DN 1280 pDN 1130) 株とDN 1300 (=DN 1
280 pDN 1290) 株のコロニー1つを、10mMのリン酸カリ
ウム緩衝液pH=7.0と0.2%グルコースを補充したL-ブ
イオンに再懸濁させる。それぞれの再懸濁液の半分を上
記培地に接種し、残りの半分を200m μ g/ml D-アラ 50

ニンを補充した同一培地に接種する。100倍または1000
倍のいずれかで培地を希釈し、培地中のD-アラニンの
存在または不存在下のいずれも良好な風通しをして37℃
で世代数に対して株が増殖する。各希釈物に対し、少な
くとも10⁷ 個細胞が形質転換する。1日の期間をおい
て、Amy^r コロニー (全部で約100) の頻度を、増殖条件
にしたがってD-アラニンを有するかまたは有しないL-
ブイオンプレートで試験する。結果を第1表に示す。
任意に選択した10個のAmy^r コロニーにはプラスミドが見
られなかった。

第1表: D-アラニン含有または
不含有LB培地中で増殖後
のAmy^r 細胞の頻度

株	プラスミド	世代		
		51%	68Amy ^r	85
DN 1297	pDN 1130	2%	20%	—
DN1297+D-ala ⁺	pDN 1130	60%	—	—
DN 1300	pDN 1290	0%	0%	0%
DN1300+D-ala ⁺	pDN 1290	60%	90%	—

1) D-アラニン含有下で最初に20世代

第1表の結果より、プラスミドpDN 1290は非選択的条
件下 (増殖培地へD-アラニンの添加) で非常に不安定
であるが、選択培地 (D-アラニンを添加せず) 中で増
殖すると安定になることがわかる。さらに、宿主染色体
においてdal⁺ 遺伝子を復原する相同的二重交差とこれに
続くプラスミド損失はDN 1300 (85世代に増殖後はAmy^r
細胞なし) では起こらず、一方D-アラニン不含有培地
中のDN 1297増殖の68世代後Amy^r 細胞の頻度は20%で
あり、これはプラスミドから染色体へのdal⁺ 遺伝子の転移
とそれに続くプラスミドの損失によるものと考えられ
る。

実施例 8

プラスミドpDN 1800の構築 (第6図)

pDN 1222の1.4Kb Bgl 2-Bgl 2断片 (第4図参照) と
pDN 1050の1.5Kb BamH I-Bgl 2断片 (第3図参照) と
を合わせてpDN 1284を構築する。

pDN 1284から、1.4Kb Bgl 2-Sal I断片におけるdal⁺
遺伝子がBamH IとSal Iで切断された古典的大腸菌ブラ
スミドベクターpBR 322へ転移する。組換えプラスミ
ド、pDN 1800:Amp^r (アンピシリン耐性) がAmp^r 選択性
大腸菌株TKL 10へ形質転換してDN 1800:pDN 1800株が得
られる。DN 1800株は1985年11月22日にNCIBに寄託され
整理番号NCIB 12181を付された。したがって、寄託の永
続性と公衆による取得可能性が保証された (上記参
照)。TKL 10は42℃でD-アラニン要求性表現型を示す
がDN 1800においてはこの要求性は抑えられる。それゆ
え、枯草菌のdal⁺ 遺伝子を有するpDN 1800はアラニンラ
セマーゼ活性が欠失した大腸菌株にD-アラニン要求性
を補うことができる。

【図面の簡単な説明】

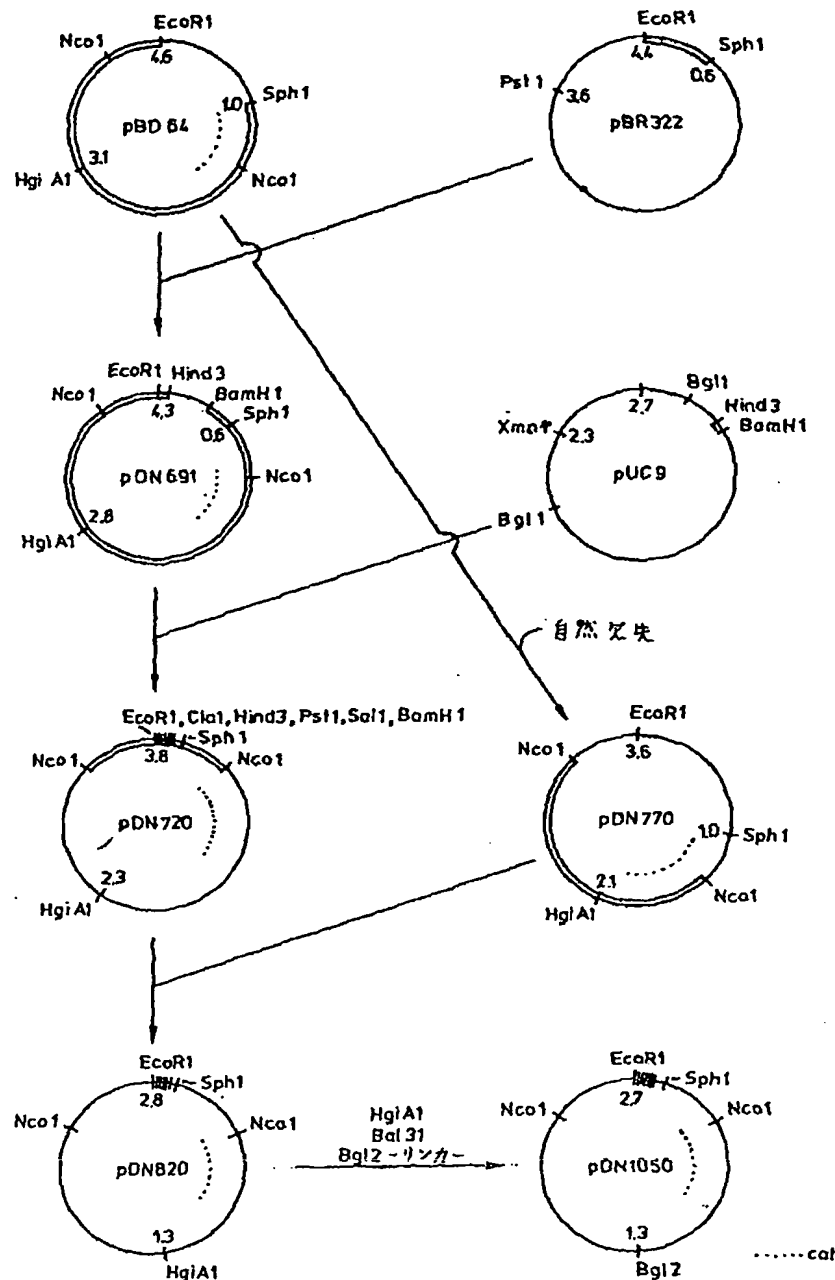
第1図は、プラスミドpDN 691, pDN 770, pDN 820およびpDN 1050の構築を表わす図式であり、
 第2図はpDN 1122の構築を表わす図式であり、
 第3図はプラスミドpDN 1090, pDN 1120, pDN 1122およびpDN 1277の構築およびpDN 1000の制限酵素部位の地図を表わす図式であり、

第4図はプラスミドpDN1130およびpDN1290の構築を表わす図式であり、

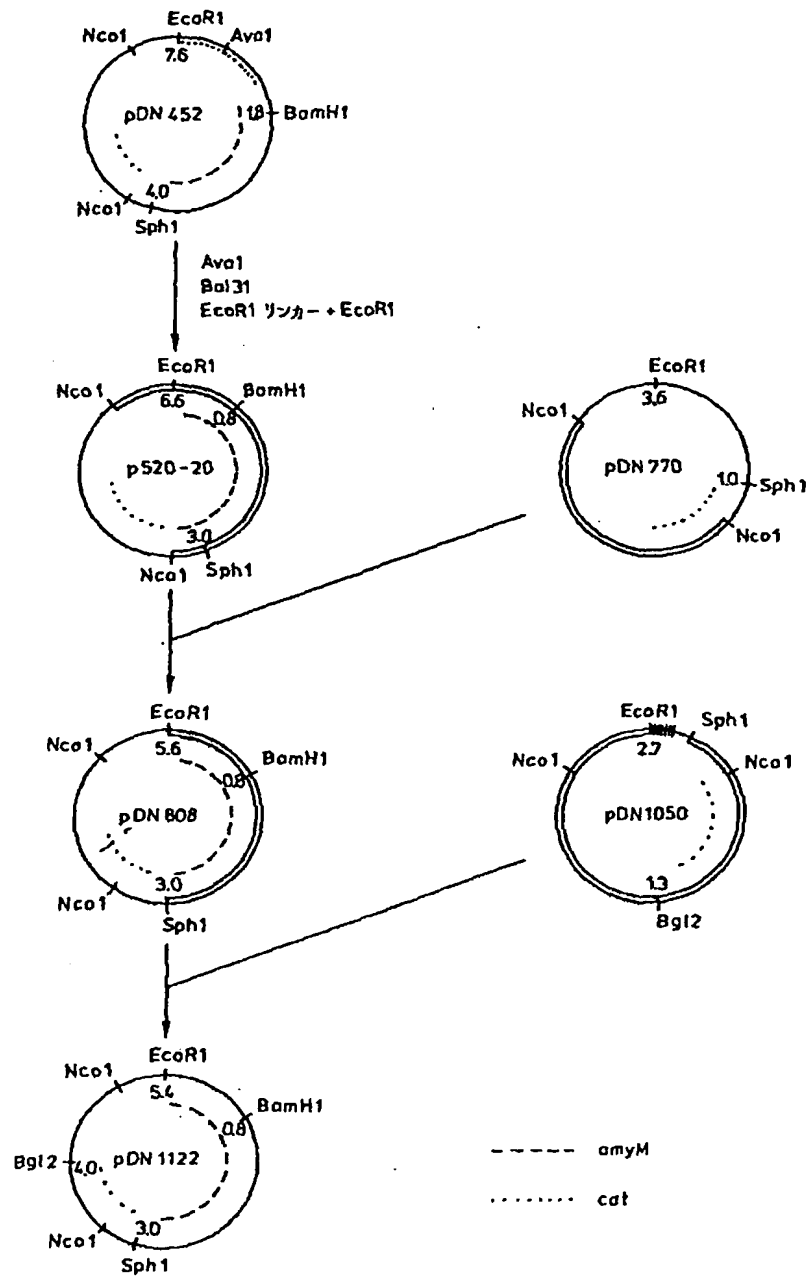
第5図はプラスミドpDN 1274の構築を表わす図式であり、

第6図はプラスミドpDN 1800の構築を表わす図式である。

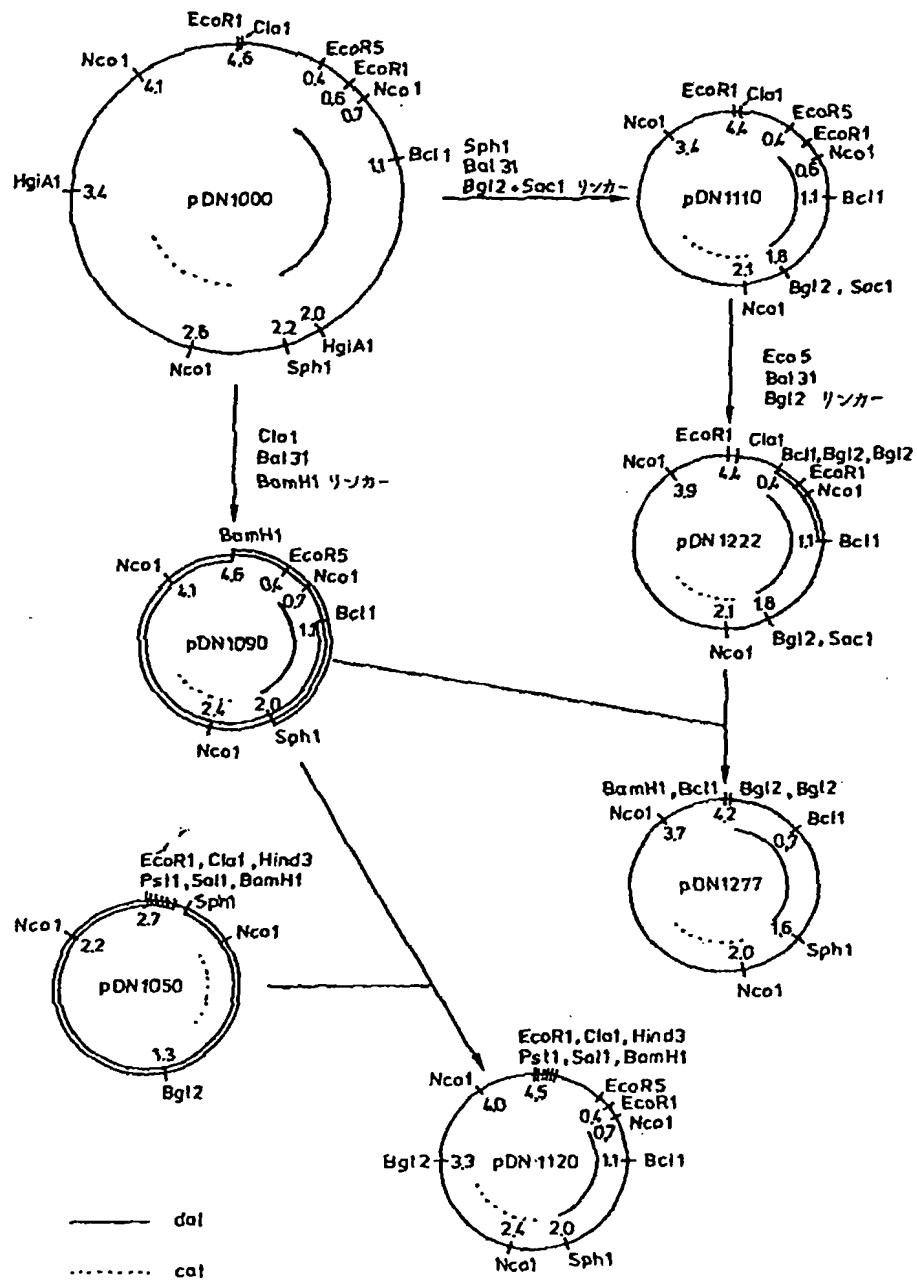
【第1図】



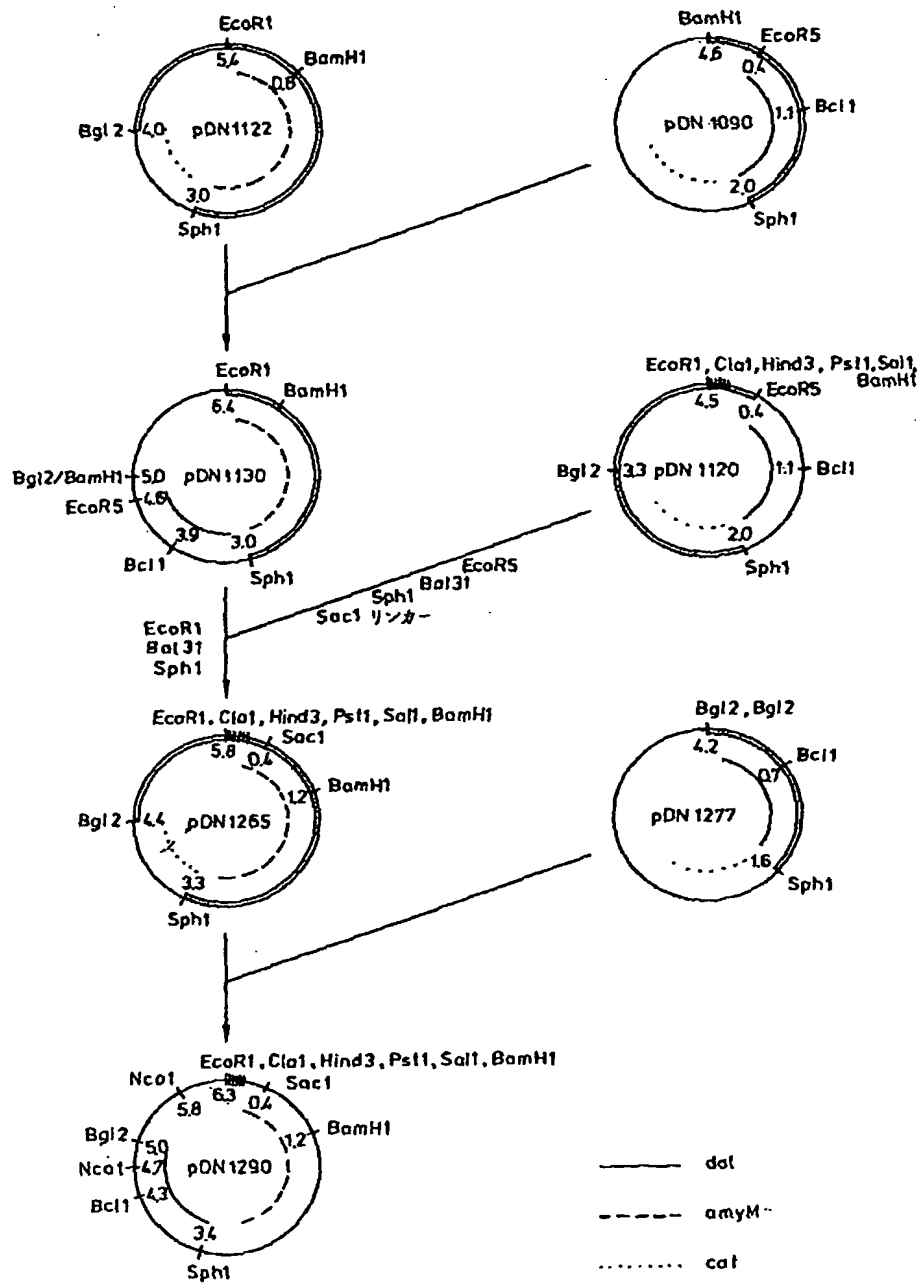
【第 2 図】



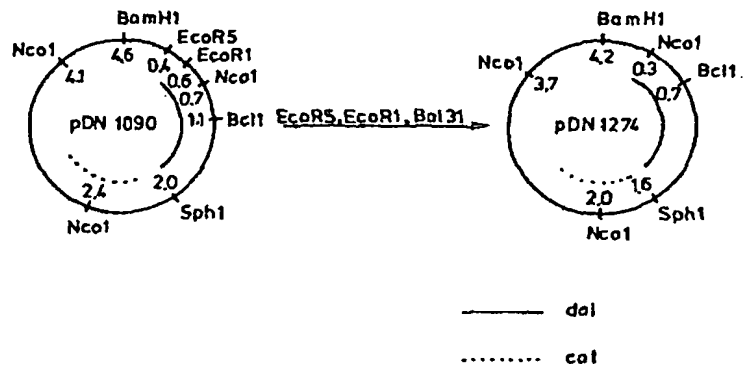
【第 3 図】



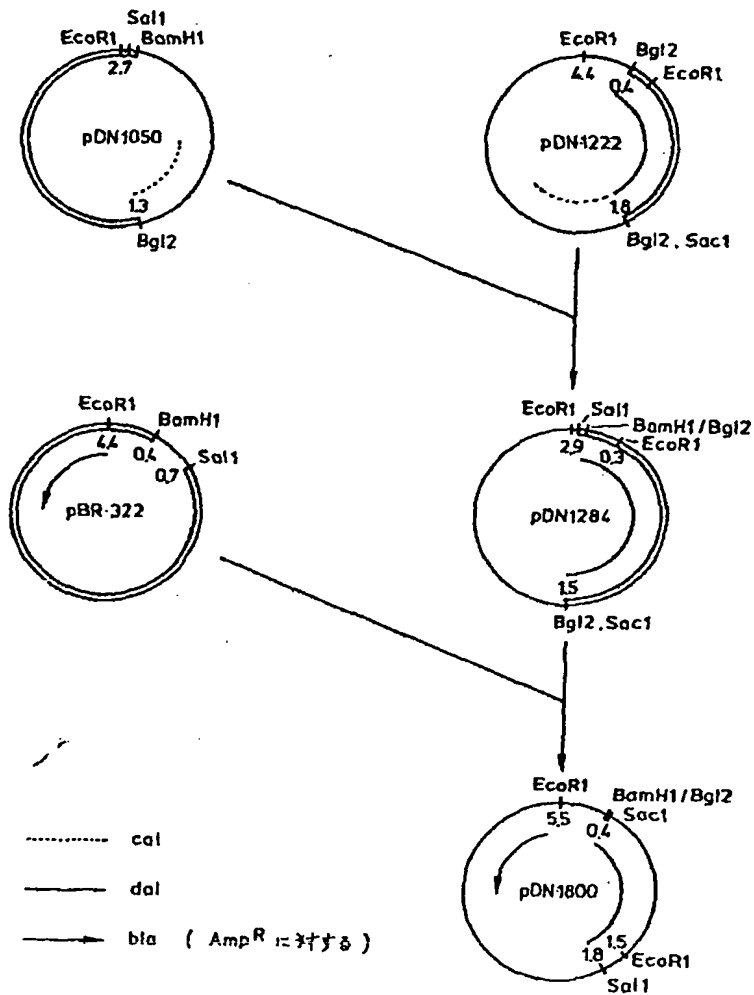
【第 4 図】



【第 5 図】



【第 6 図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶ C12R 1:19)	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
---	------	--------	-----	--------

(56) 参考文献 Biochemistry, 23 (22)
) P. 5182-5187 (1984)
J. Bacteriol., 153 (3)
) P. 1439-1450 (1983)
飯野徹雄等編「組換えDNA実験技術」
(株) 学会出版センター発行 (1984)
. 6. 10) P. 61-72